

ÉTUDE CHIMIQUE ET SPECTROSCOPIQUE DES PHYCOCOLLOÏDES EXTRAITS DE *DILSEA CARNOSA* (RHODOPHYCÉE, CRYPTONÉMIALE).

Mustapha ZINOUN, Eric DESLANDES et Joël COSSON

Laboratoire d'Algologie fondamentale et appliquée
39, rue Desmoueux, 14000 Caen (France)

RÉSUMÉ - Les phycocolloïdes de *Dilsea carnosa* ont été étudiés par des méthodes chimiques et spectroscopiques (IR et RMN). Cette étude montre l'hétérogénéité de la paroi de cette algue avec l'existence d'un carraghénane majoritaire de type lambda partiellement désulfaté et d'une fraction minoritaire à propriété gélifiante. L'extrait renferme par ailleurs une fraction méthylée ainsi qu'un polysaccharide neutre de réserve: l'amidon floridéen.

ABSTRACT - Chemical and spectroscopic methods (IR and NMR-spectroscopy) were used to identify the phycocolloids of *Dilsea carnosa*. Our study shows the cell wall of this alga is heterogenous with a partly desulfated lambda-carrageenan as the major component and a minor component with gelling properties. The extract also contained a methylated fraction and a neutral polysaccharid identified as floridean starch.

MOTS CLÉS : Carraghénanes, *Dilsea carnosa*, Rhodophycées, RMN, IR.

INTRODUCTION

Dilsea carnosa (Schmidel) Kuntze, est une algue fréquemment rencontrée sur les côtes de la Manche dans les cuvettes exposées de l'étage médio-littoral et dans l'infra-littoral.

Dès 1945, Barry & Dillon, puis Barry & McCormick (1957) ont étudié la composition chimique de cette espèce et en particulier les mucilages qui renferment selon eux du D-galactose, du D-xylose, de l'acide glucuronique, des sulfates et des traces de 3,6-anhydrogalactose. En 1959, Peat *et al.* mettent en évidence l'existence d'un polysaccharide neutre de réserve appelé amidon floridéen ("floridean starch") et caractérisé par l'existence de liaisons $\alpha(1-4)$ et $\alpha(1-3)$ glucosidiques; par contre, l'étude des polysaccharides pariétaux de *Dilsea carnosa* n'a jamais été achevée. Aussi avons-nous, dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles sources de phycocolloïdes, entrepris l'étude par des méthodes biochimiques et spectroscopiques des phycocolloïdes extraits de *Dilsea carnosa* récoltée en Basse-Normandie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les algues ont été récoltées au Cap Lévy (Manche) de janvier à mai 1989; les thalles, triés, débarrassés des épiphytes, lavés à l'eau douce pendant 5 minutes, sont traités par l'acétone et l'éthanol pour éliminer les pigments et la fraction organosoluble.

Après séchage à 60°C pendant 16h, les algues sont réduites en poudre avec un broyeur à billes. L'extraction des phycocolloïdes est réalisée selon la méthode préconisée par Bellion *et al.* (1983). Les polysaccharides sont précipités sélectivement selon le protocole de Craigie & Leigh (1978).

Les glucides totaux sont dosés selon Dubois *et al.* (1956), le 3,6-anhydrogalactose par la méthode au resorcinol de Yaphe & Arsenault (1965), les sulfates par la méthode turbido métrique de Jackson & McCandless (1978) et la transformation alcaline selon la méthode de Rees (1961).

La composition en sucres monomères a été établie par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Perkin-Elmer type 8500, équipé d'une colonne en verre (1.8m 1:8), support 3% de SP. 2340 sur Supelcoport 100/200 mesh à 210°C, l'inositol étant l'étalon interne; les dérivés acétylés sont identifiés par un détecteur à ionisation de flamme.

Les spectres infra-rouges ont été enregistrés par un spectromètre (Nicolet-Analytical Instrument Ms 60 en transformé de Fourier). Les échantillons sont présentés sous forme de pastilles de 16mm de diamètre, obtenues sous pression et diluées auparavant dans du KBr. Les spectres RMN du ¹³C ont été réalisés sur un spectromètre Bruker AC 300 à 75,45MHz à 80°C, les dilutions des échantillons étant de 20 à 30mg/ml de D₂O. Les déplacements chimiques (ppm) sont mesurés par rapport à l'étalon interne TSP (Tetra-deutero-triméthylsilyl) et convertis à l'étalon externe TMS (Tetraméthyl silane).

L'hydrolyse enzymatique est réalisée par des amylases (EC.3.2.1.1) et des dextrinases (EC.3.2.1.11) fournies par Sigma SA.

RÉSULTATS

1. Dosage et analyses chimiques

Le rendement en phycocolloïdes, après extraction totale, est de 30% (±3) par rapport à la masse de matière sèche. La composition en sucres, avant et après purification par voie enzymatique, est donnée dans le tableau I.

Cette analyse révèle la présence de galactose comme sucre majoritaire, les autres sucres étant faiblement représentés. La teneur en glucose augmente de février (5%) à mai (15%). Cette augmentation printanière peut être attribuée à une reprise importante de l'activité photosynthétique de l'algue conduisant à la production d'amidon floridéen.

	Galactose	Glucose	Xylose	6-O-Me -D.galactose
Sans traitement enzymatique	75	12,44	3,7	7,6
Avec traitement enzymatique	86,6	Traces	3,5	7,5

Tableau I - Composition en sucre de l'extrait total de *Dilsea carnosa* avant et après hydrolyse enzymatique de l'amidon floridéen (les valeurs sont exprimées en % de la masse de sucres avec une erreur moyenne de 5%).

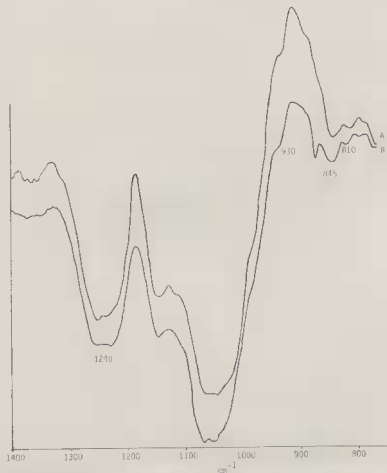


Fig. 1 - Spectre infra-rouge de l'extrait de *Dilsea carnosa*: A: extraction totale. B: après transformation alcaline.

L'extrait présente un pouvoir rotatoire positif

$$[\alpha]_{20}^D + 60,$$

ce qui confère une configuration D au sucre majoritaire (D. galactose). La teneur en sulfates de l'extrait est de 22% par rapport à la masse de l'extrait sec et celle de 3,6-anhydrogalactose est de 7%. En raison de ces constatations, le polysaccharide de *Dilsea carnosa* serait un carraghénane.

2. Étude en spectroscopie infrarouge

Le spectre IR (Fig. 1) de l'extrait total de *Dilsea carnosa* est caractérisé par une large bande à 1240 cm^{-1} (vibration du S=O du SO_4), un épaulement à 930 cm^{-1} (vibration du pont 3,6-anhydrogalactose), une bande à 850 cm^{-1} (vibration C-O-S de SO_4 en C_4 du beta D-galactose) et une bande plus faible à 810 cm^{-1} (vibration C-O-S de SO_4 en C_6).

Ce spectre infrarouge est proche de celui obtenu sur un extrait de *Grateloupia filicina* par Zablakis *et al.* (1990) et qui leur permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas d'un véritable carraghénane lambda.

Après hydrolyse alcaline on ne note aucune modification significative du spectre, ce qui traduit l'absence de formation de pont 3-6-anhydro sur la molécule du galactose. Cette observation est en contradiction avec les résultats de Rees (1961).

3. Étude en résonance magnétique nucléaire du ^{13}C

Avant de réaliser l'étude du polysaccharide en RMN du ^{13}C , il est nécessaire de traiter la fraction à analyser par voie enzymatique, afin d'hydrolyser l'amidon floridécen et de le séparer du carraghénane.

Après action des enzymes, les carraghénanes sont précipités dans un double volume d'éthanol à 95° , alors que les produits d'hydrolyse passent en solution. Le précipité est récupéré par centrifugation à 5000g pendant 30 minutes.

La fraction soluble dans l'alcool est récupérée par évaporation du solvant et la teneur en glucose mesurée par le système glucose-oxydase/peroxydase.

Le spectre RMN du ^{13}C (Figs 2 et 3) des polysaccharides pariétaux met en évidence au moins deux structures:

* la structure lambda caractérisée par $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ des carbones anomères du galactose (Fig. 2). Cette structure est analogue à celle retrouvée chez *Kallymenia reniformis* (Deslandes *et al.*, 1989);

* dans la région de 95 à 105ppm, il y a apparition de 2 pics, X: 104, 5 et Y: 95,8, caractéristiques des mu-carraghénanes précurseurs du kappa-carraghénane selon Bellion *et al.* (1983).

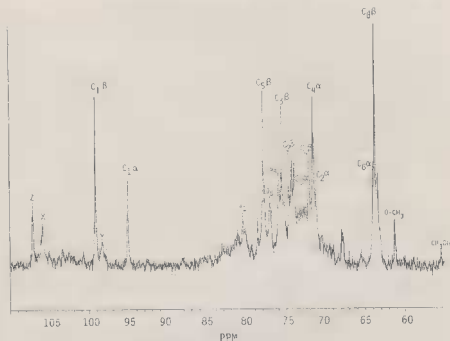


Fig. 2 - Spectre RMN du ^{13}C de l'extrait total de *Dilsea carnosa*.

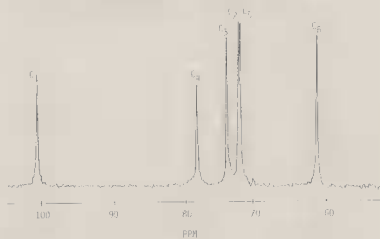


Fig. 3 - Spectre RMN du ^{13}C de l'amidon floridéen extrait de *Dilsea carnosa*.

La structure kappa elle-même n'est pas suffisamment marquée sur ces spectres, la fraction correspondante étant trop peu abondante, proportionnellement aux lambda-carraghénanes, pour être détectée par l'appareil.

Par ailleurs, dans la zone allant de 50 à 60 ppm, il y a apparition d'un pic à 59,1 ppm qui a été attribué à un groupement méthyle (Bellion, 1983).

Dans la zone allant de 70 à 75 ppm, il y a apparition de 3 pics non identifiés qui peuvent être attribués aux perturbations que provoque le groupement méthyle sur les carbones les plus proches de son environnement.

Le spectre RMN du ^{13}C (Fig. 3) de la fraction formée par le polysaccharide neutre de réserve montre la présence d'une seule structure: les valeurs des déplacements chimiques sont proches de celles obtenues par Colson *et al.* (1974) pour l'amylose des végétaux supérieurs.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

D'après O'Colla (1962), le mucilage extrait de *Dilsea carnosa* a été classé comme un polygalactane faiblement sulfaté différent des carraghénanes kappa et lambda.

La présence du D-galactose et la teneur en sulfates supérieure à 20% montrent clairement que le phycocolloïde extrait de *Dilsea carnosa* est un carraghénane. L'étude par spectroscopie RMN du ^{13}C met en évidence d'une part la présence d'un motif de base formé de deux unités galactose (α et β), proche du polygalactane de type lambda extrait de *Kalymentia reniformis* avec cependant un degré de sulfatation relativement faible (22%, au lieu des 30% habituellement reconnus pour un carraghénane de type λ), d'autre part la présence d'une fraction minoritaire partiellement méthylée à propriété gélifiante proche d'une structure de type kappa. Cette hypothèse se trouve confortée par l'existence dans l'extrait total d'un carraghénane précurseur de type mu.

Il restera donc ultérieurement à vérifier cette hypothèse en séparant ces deux fractions. Néanmoins ces premiers résultats montrent à l'évidence l'hétérogénéité de la paroi et du ciment intercellulaire de *Dilsea carnosa*.

REMERCIEMENTS. - Les auteurs remercient M. Brigand de la Société SANOFI-Bio-Industries pour les analyses effectuées en Chromatographie en Phase Gazeuse, ainsi que M.M. Lamotte et Badri du Laboratoire ISMRA de Spectrochimie de l'Université de Caen pour les analyses effectuées en IR.

BIBLIOGRAPHIE

- BARRY V.C. & DILLON T., 1945 - The mucilage of *Dilsea edulis*. *Proc. Roy. Irish Acad.* B 50: 349-354.
- BARRY V.C. & McCORMICK J.E., 1957 - Properties of periodate-oxidized polysaccharides. VI: The mucilage from *Dilsea edulis*. *J. Chem. Soc.* 2: 2777-2783.
- BELLION C., BRIGAND G., PROMÉ J.C., WELTI D. & BOCIEK S., 1983 - Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie RMN du ^{13}C . *Carbohydr. Res.* 119: 31-38.

- COLSON P., JENNINGS H.J. & SMITH I.C.P., 1974 - Composition, sequence and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance. *J. Amer. Chem. Soc.* 96: 8081-8087.
- CRAIGIE J.S. & LEIGH C., 1978 - Carrageenans and agars. In HELLEBUST, J.A. & CRAIGIE J.S. "*Handbook of Phycological Methods: physiological and biochemical methods*", Cambridge University Press, pp. 109-131.
- DESLANDES E., POTIN P., ZINOUN M. & FLOCH J.Y., 1989 - Contribution on the content and nature of the phycocolloids from *Kallymenia reniformis* (Turner) J. Agardh. *Proc. 13th Intl. Seaweed Symp., Hydrobiologia* (sous presse).
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., ROBERS P.A. & SMITH F., 1956 - Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- JACKSON S.G. & Mc CANDLESS E.L., 1978 - Simple, rapid turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Anal. Biochem.* 90: 802-808.
- O'COLLA P.S., 1962 - Mucilages. In R.A. LEWIS (Ed.), *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, New York, pp. 337-356.
- REES D.A., 1961 - Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.* 4: 5168-5171.
- YAPHE W. & ARSENAULT G.P., 1965 - Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.* 13: 143-148.
- ZABLACKIS E. & PEREZ J., 1990 - A partially pyruvated carrageenan from hawaiian *Grateloupia filicina* (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 33: 273-276.